



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

FLORE

Repository istituzionale dell'Università degli Studi di Firenze

Misure spettrali di assorbimento e fluorescenza in vivo del fitoplancton

Questa è la Versione finale referata (Post print/Accepted manuscript) della seguente pubblicazione:

Original Citation:

Misure spettrali di assorbimento e fluorescenza in vivo del fitoplancton / Massi L.; Lazzara L.. - STAMPA. - (2010), pp. 389-404.

Availability:

This version is available at: 2158/373994 since:

Publisher:

SIBM, ISPRA

Terms of use:

Open Access

La pubblicazione è resa disponibile sotto le norme e i termini della licenza di deposito, secondo quanto stabilito dalla Policy per l'accesso aperto dell'Università degli Studi di Firenze (<https://www.sba.unifi.it/upload/policy-oa-2016-1.pdf>)

Publisher copyright claim:

(Article begins on next page)

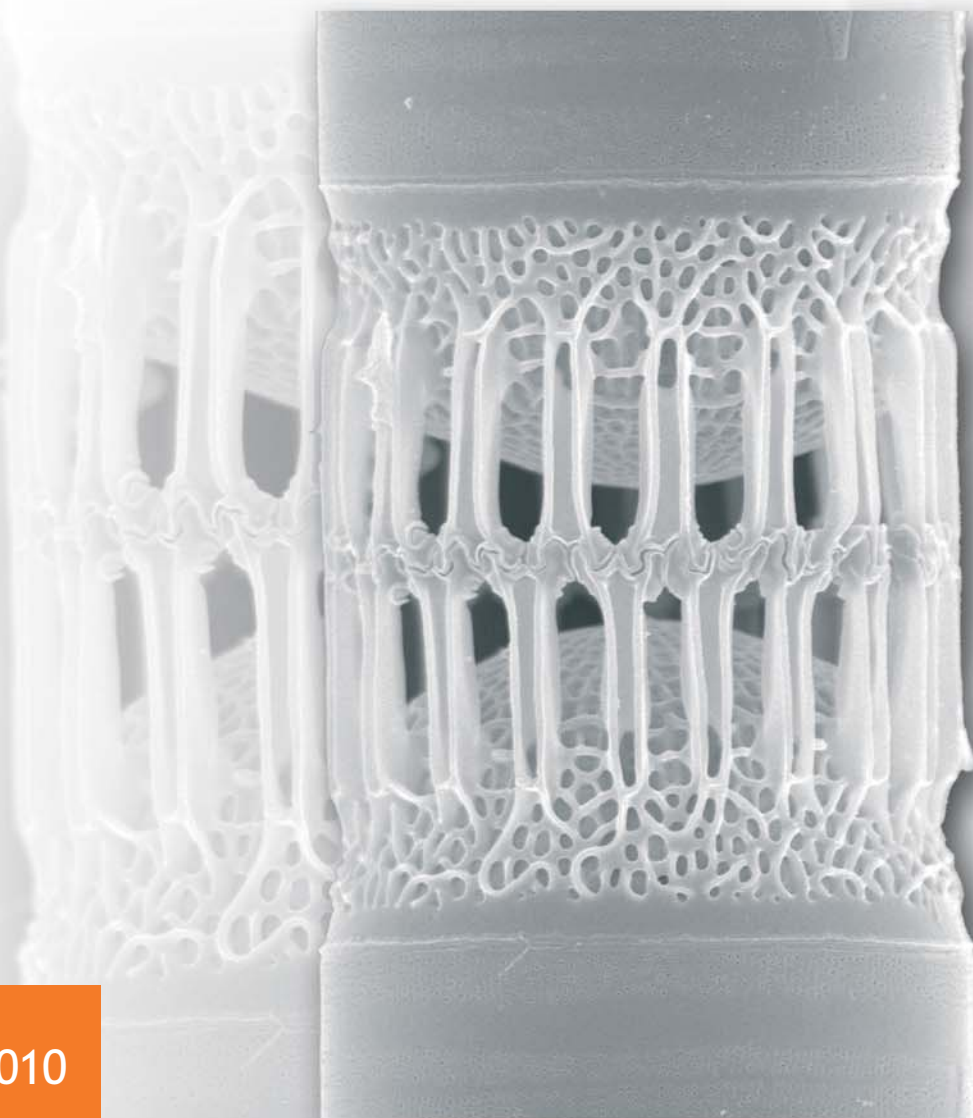


ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale

S.I.B.M.
Società Italiana
di Biologia Marina

Metodologie di studio del Plancton marino



MANUALI E LINEE GUIDA



ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale

Metodologie di studio del plancton marino

edito da

Giorgio Socal¹, Isabella Buttino², Marina Cabrini³, Olga Mangoni⁴,
Antonella Penna⁵, Cecilia Totti⁶

1 Istituto di Scienze Marine CNR, Venezia

2 Stazione Zoologica Anton Dohrn, Napoli - indirizzo corrente: ISPRA, Livorno

3 Istituto Nazionale di Oceanografia e Geofisica Sperimentale, Trieste

4 Dipartimento delle Scienze Biologiche, Sezione di Zoologia, Università degli Studi Federico II, Napoli

5 Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Sezione Biologia Ambientale, Università di Urbino

6 Dipartimento di Scienze del Mare. Università Politecnica delle Marche, Ancona

Gli editori e gli autori tutti dedicano questo volume alla memoria dei compianti
Elvezio Ghirardelli e Donato Marino

Manuali e Linee Guida 56/2010

Informazioni legali

L'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) e le persone che agiscono per conto dell'Istituto non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questo manuale.

ISPRA – Istituto Superiore per la protezione e la ricerca ambientale
Via Vitaliano Brancati, 48 – 00144 Roma
www.isprambiente.it

ISPRA, Manuali e Linee Guida 56/2010

ISBN 978-88-448-0427-5

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica

ISPRA

Grafica di copertina: Franco Iozzoli

Foto di copertina: Foto al Microscopio elettronico a scansione della diatomea *Skeletonema japonicum* di Maria Saggiomo, eseguita presso la Stazione Zoologica Anton Dohrn di Napoli

Coordinamento tipografico:

Daria Mazzella

ISPRA - Settore Editoria

Amministrazione:

Olimpia Girolamo

ISPRA - Settore Editoria

Distribuzione:

Michelina Porcarelli

ISPRA - Settore Editoria

Impaginazione e Stampa

Tipolitografia CSR - Via di Pietralata, 157 - 00158 Roma

Tel. 064182113 (r.a.) - Fax 064506671

Finito di stampare giugno 2010

CAPITOLO 35. MISURE SPETTRALI DI ASSORBIMENTO E FLUORESCENZA *IN VIVO* DEL FITOPLANCTON

L. Massi, L. Lazzara

luca.massi@unifi.it

35.1 INTRODUZIONE

Le tecniche per le misure di assorbimento e fluorescenza *in vivo* proposte consentono di determinare le principali proprietà spettrali del fitoplancton. Uno degli aspetti cruciali, in comune alle due misure, consiste nel fornire risultati che approssimano al meglio i reali valori *in vivo* di queste grandezze. Infatti, sia l'assorbimento che la fluorescenza del fitoplancton sono molto sensibili alle condizioni ambientali ed ai possibili artefatti di misura, perciò è necessario operare con la minima invasività, nel caso della fluorescenza o con robusti protocolli di misura valutati nel corso del tempo, nel caso dell'assorbimento.

Entrambe le tecniche posseggono una elevata sensibilità così da rendere possibile le misure anche negli ambienti più oligotrofici; per la fluorescenza l'alta sensibilità è legata alla misura diretta di un flusso fotonico piuttosto che ad un rapporto tra due flussi, e per l'assorbimento con il metodo *filter-pad* può essere raggiunta semplicemente aumentando i volumi di acqua filtrata.

Sia l'assorbimento che la fluorescenza del fitoplancton sono proprietà fondamentali anche in relazione agli studi di produzione primaria in mare (Lazzara, 1995; Kromkamp e Foster, 2003). In un recente lavoro Marra *et al.* (2008) affermano che le variazioni di produzione primaria sono più strettamente correlate con le misure dell'assorbimento fitoplanctonico, che con quelle di clorofilla *a* totale.

Entrambe le proprietà sono stimabili negli strati superficiali dei corpi idrici, utilizzando sensori ottici remoti, attivi nel caso della fluorescenza e passivi per l'assorbimento. Si tratta perciò di misure utili e necessarie allo sviluppo ed affinamento delle metodiche di telerilevamento delle risorse biologiche marine (Mueller *et al.*, 2002).

Infine va sottolineato, che negli studi di bio-ottica marina un opportuno completamento alle misure oggetto di questa descrizione è costituito dalle misure di irradianza *in situ*, di queste una trattazione approfondita sia dal punto di vista teorico che metodologico è riportata in Innamorati (1990) che evidenzia in particolare le relazioni fra proprietà ottiche apparenti, generalmente misurate *in situ*, e proprietà ottiche inerenti.

35.2 ASSORBIMENTO

Per comprendere i processi fotobiologici nelle acque naturali ed interpretarne le variazioni di colore (riflettanza spettrale) è essenziale la misura dell'assorbimento della radiazione visibile (PAR) ed in particolare quello della componente fitoplanctonica. La misura della frazione di PAR assorbita è di fondamentale importanza per la valutazione della produzione primaria degli ecosistemi acquatici. Solitamente in acqua la radiazione visibile risulta profondamente alterata (quantitativamente e spettralmente) rispetto a quella solare, tanto da risultare limitante per la fotosintesi. La disponibilità luminosa e le sue caratteristiche spettrali sono variabili e dipendono dalla composizione del mezzo acquoso e dalla profondità. Gli organismi vegetali che vivono in questi ambienti hanno molto ampliato, durante il processo evolutivo, la loro dotazione pigmentaria, differenziando nei diversi gruppi algali il contenuto pigmentario e quindi le caratteristiche spettrali dell'assorbimento.

Il coefficiente di assorbimento misurabile nei vari punti di un corpo d'acqua naturale è una proprietà ottica inerente che risulta dalla somma dei contributi di ognuno dei suoi componenti otticamente attivi: $a(\lambda) = a_w(\lambda) + a_p(\lambda) + a_y(\lambda)$; dove a_w è l'assorbimento dell'acqua, a_y è quello della sostanza organica disciolta

colorata (sostanza gialla o gilvina), a_p è l'assorbimento delle sostanze particellate ($a_p(\lambda) = a_{ph}(\lambda) + a_{NAP}(\lambda)$) ed è costituito dalla somma di quello fitoplanctonico a_{ph} e di quello, a_{NAP} , del particellato non algale (*non algal particles*, NAP). Il NAP nelle acque di caso 1 (Morel, 1988) è prevalentemente di natura organica ed è chiamato detrito (*detritus*), mentre in quelle di caso 2 spesso è prevalente la frazione inorganica ed è designato come sedimento in sospensione (*suspended sediments* o *suspended mineral*).

L'assorbimento *in vivo* del fitoplancton risulta assai differente dalla semplice somma degli assorbimenti in soluzione dei vari pigmenti presenti. Infatti questi nelle strutture cellulari modificano le loro proprietà ottiche, sia spostando i massimi di assorbimento verso le lunghezze d'onda maggiori (Bidigare *et al.*, 1990), sia riducendo la somma dei loro assorbimenti in maniera variabile in relazione a dimensioni e forme cellulari e alle concentrazioni intracellulari degli stessi. Questi effetti sono determinati dalle modalità con cui i pigmenti si associano all'interno delle cellule fitoplanctoniche e consistono nel cosiddetto "package-effect" (Duysens, 1956; Morel e Bricaud, 1981).

35.2.1 Principio del metodo

Le sospensioni fitoplanctoniche sono otticamente più complesse delle soluzioni, in quanto oltre ad assorbire la luce la diffondono (Duntley, 1942), così la legge di Lambert-Beer non può essere applicata semplicemente come nelle soluzioni. Le misure spettrofotometriche di densità ottica in assetto standard (*absorbance* o *optical density*, $A = \log(I/T)$) delle sospensioni si riferiscono ad una grandezza intermedia fra assorbimento e attenuazione (la somma di assorbimento e diffusione) in relazione all'angolo di accettazione e alla distanza fra cuvetta e detector dello spettrofotometro usato. Per meglio stimare l'assorbimento occorre: 1) convogliare verso il detector quanti più fotoni possibile, per esempio avvicinando il detector al campione (Privoznik *et al.*, 1978); 2) utilizzare un vetro diffusore (Shibata *et al.*, 1954) per rendere omogeneamente diffuso il flusso in uscita, e raccoglierne una frazione per il tutto.

Nella maggior parte dei casi la concentrazione fitoplanctonica nei campioni naturali è largamente insufficiente per una misura diretta (e quindi auspicabile) dell'assorbimento sulla sospensione, così l'approccio più utilizzato per effettuare le misure di assorbimento del fitoplancton prevede di concentrare su un filtro il particellato marino di cui fa parte il fitoplancton (Yentsch, 1957). Il filtro così ottenuto consente di effettuare misure allo spettrofotometro anche nelle acque marine più oligotrofiche. Inoltre Yentsch (1962) ha mostrato che il filtro stesso può essere utilizzato come diffusore.

Le differenti proprietà diffusive dei campioni dovute alla loro concentrazione, alle dimensioni, al contenuto pigmentario ed all'indice di rifrazione possono generare errori nelle misure di assorbimento del particellato e del fitoplancton. Questi errori possono essere fortemente ridotti facendo le misure di trasmittanza (*transmittance*, $T = I_t / I_0$ e cioè il rapporto fra il flusso radiante trasmesso e quello incidente) con uno spettrofotometro munito di sfera integratrice che consente di raccogliere tutti i fotoni diffusi (Geider e Osborne, 1992; Kirk, 1994). Inoltre, l'utilizzo di sfere integratrici che permettano di effettuare sia misure di trasmittanza che di riflettanza (*reflectance*, $R = I_r / I_0$ e cioè il rapporto fra il flusso radiante retrodiffuso e quello incidente) ed ottenere l'assorbanza (*absorbance*, $a = I_a / I_0$ e cioè il rapporto fra il flusso radiante assorbito e quello incidente) consente di effettuare misure di assorbimento tenendo in debito conto gli effetti della retrodiffusione dell'insieme particellato + filtro (metodo *T-R*, Tassan e Ferrari, 1995). Questi effetti possono essere molto importanti sia nelle acque oligotrofiche, dove è significativa la presenza di picoplancton, che in quelle di caso 2 ricche di sedimenti in sospensione.

Il confronto quantitativo fra le misure effettuate sul particellato concentrato sui filtri e quelle effettuate direttamente su sospensione ha evidenziato che le prime risultano circa doppie, e quindi la necessità di una loro correzione. La differenza è relativa all'amplificazione del cammino ottico (fattore *b*) legato all'elevata probabilità di diffusioni multiple che si verificano a causa dell'introduzione nelle misure di un mezzo fortemente diffondente come i filtri in fibra di vetro (Butler, 1962; Kiefer e SooHoo, 1982). Il fattore *b* in realtà risulta variabile in relazione alla composizione del particellato e del fitoplancton ed in particolare rispetto alle loro dimensioni prevalenti (*b* maggiore con dimensioni minori). Recentemente

è stato introdotto un metodo che aggira questo problema trasferendo il particellato raccolto sul filtro su un vetrino da microscopia sul quale viene analizzato (Allali *et al.*, 1995). Senza la forte diffusione dei filtri vengono meno i problemi derivanti dall'amplificazione del cammino ottico e gli assorbimenti ottenuti sono comparabili con quelli delle sospensioni.

La stima dell'assorbimento del fitoplancton non può essere effettuata senza una distinzione della frazione fitoplanctonica dal resto del particellato. Questo problema di notevole interesse ecologico e biogeochimico è stato affrontato con varie metodologie principalmente di tipo chimico e matematico (Kishino *et al.*, 1985; Bricaud e Stamski, 1990; Cleveland e Perry, 1994). Attualmente la più utilizzata è quella chimica che prevede misure di assorbimento del particellato totale da effettuare prima e dopo l'estrazione dei pigmenti fitoplanctonici in metanolo (Kishino *et al.*, 1985). Lo spettro di assorbimento del fitoplancton è ottenuto per differenza. L'estrazione pigmentaria può essere incompleta o parziale, come nel caso dei pigmenti idrosolubili. Queste evenienze si configurano come un incremento dell'assorbimento della frazione non fitoplanctonica rispetto alla fitoplanctonica. In alternativa può essere utilizzato per depigmentare le cellule fitoplanctoniche l'ipoclorito di sodio (NaClO), che risulta efficace sia sui pigmenti liposolubili che sugli idrosolubili (Tassan e Ferrari, 1995), ma richiede una elevata accortezza nei dosaggi del cloro in relazione alla quantità di fitoplancton. In realtà questi metodi mantengono qualche ambiguità riguardo sia all'assorbimento del particellato depigmentato che include quello delle strutture cellulari residue e viene fatto coincidere con quello del *NAP*, sia per una possibile incertezza sull'assorbimento del fitoplancton ottenuto per differenza che include quello dei feoforbidi presenti nelle *fecal pellets*.

Ad oggi una notevole attività di ricerca è stata sviluppata in questo campo tanto da mettere a punto robusti protocolli che consentono di ottenere stime abbastanza accurate dell'assorbimento del fitoplancton e della frazione particellata non fitoplanctonica (Mitchell *et al.*, 2000; Mitchell *et al.*, 2002).

Le procedure per la misura dell'assorbimento del fitoplancton di seguito riportate, che in parte differiscono da quelle dei citati protocolli, sono risultate, sulla base dell'esperienza (Massi *et al.*, 1997; Maselli *et al.*, 2009), una sintesi accettabile fra il rigore teorico e la semplificazione pratica.

Un'alternativa al metodo di misura dell'assorbimento del fitoplancton proposto e di seguito descritto può essere quella della ricostruzione dello spettro di assorbimento basata sulla conoscenza del contenuto pigmentario ottenuto con analisi HPLC (Bidigare *et al.*, 1990). Questa tecnica risulta certamente vantaggiosa per la sua semplicità e per la sua precisione nell'includere solo i pigmenti fitoplanctonici, ma poiché le misure non sono effettuate con i pigmenti collocati nelle strutture cellulari intatte non tiene conto del *package-effect*, che è una importante fonte di variabilità (Bricaud *et al.*, 1995) e generalmente non fornisce una realistica quantificazione dell'assorbimento *in vivo*.

Attualmente per le misure di assorbimento totale, sono anche disponibili strumenti capaci di effettuare misure spettrali di assorbimento *in situ* anche in ambienti oligotrofici. Il più conosciuto è la sonda ac-9 (WetLabs) che possiede due tubi di misura a luce collimata, uno con le pareti a riflessione interna per le misure di assorbimento, mentre l'altro è del tipo a pareti oscurate per misure di attenuazione. Le misure sono effettuate su 9 lunghezze d'onda selezionate con filtri interferenziali. Inoltre sono disponibili altri nuovi strumenti come a-Sphere (HobiLabs) con cui le misure di assorbimento ad alta risoluzione spettrale sono effettuate in una sfera integratrice dove viene pompata l'acqua marina.

35.2.2 Metodo

35.2.2.1 Materiale occorrente

- Bottiglie in plastica scure con capacità da 1 a 6 l, tubi in tygon Ø 6-8 mm
- Filtri Whatman GF/F Ø 25 mm, filtri Nuclepore PC porosità 0,2 µm, Ø 25 o 47 mm
- Vetreria da laboratorio, cilindri graduati, pipette ecc.
- Apparato di filtrazione con pompa a vuoto regolabile, trappola
- Pinzette per filtri, capsule porta filtri

-
- Spettrofotometro con sfera integratrice per misure di trasmittanza e riflettanza
 - Metanolo puro per analisi
 - Azoto liquido, congelatore -80 °C, frigorifero

35.2.2.2 Schema delle operazioni

Filtrazione

I campioni di acqua marina raccolti usando bottiglie tipo Niskin e trasferiti immediatamente tramite tubi puliti in tygon in recipienti oscurati, puliti ed avvinati devono essere velocemente filtrati su filtri in fibra di vetro Whatman GF/F (porosità nominale di 0,7 μm) Ø 25 mm. Questi filtri prima della loro utilizzazione vanno imbibiti in acqua di mare filtrata (0,2 μm) per almeno 30 minuti per favorire un'omogenea sedimentazione del particellato.

Per ottimizzare le misure spettrofotometriche e facilitare la correzione del fattore di amplificazione del cammino ottico, le densità ottiche del particellato sui filtri devono essere superiori (perlomeno sui massimi) di 0,2-0,3 (Bricaud e Stramski, 1990; Mitchell, 1990); sono inoltre da evitare anche concentrazioni di particellato che determinano densità ottiche superiori di 0,5 – 0,6. Per questo volumi variabili di acqua marina (da qualche ml fino a 5-6 l) devono essere filtrati in relazione al loro contenuto di particellato.

È necessario fare attenzione alla faccia del filtro dove viene fatto sedimentare il particellato ed usare sempre la stessa sia per i campioni che per i bianchi (si consiglia quella a trama meno regolare che generalmente è la faccia concava). Le due facce dei filtri GF/F presentano proprietà filtranti analoghe, ma caratteristiche ottiche leggermente differenti.

La procedura di filtrazione deve avvenire secondo le indicazioni riportate in Lazzara *et al.* (vedi Capitolo 33) e comunque sempre a luce soffusa, con deboli depressioni (max 150 mm Hg), senza fare andare a secco il filtro ed interrompendo prontamente il vuoto al termine. A filtrazione conclusa, oltre che prendere nota del volume di acqua marina filtrata, occorre conoscere la superficie del filtro dove si è depositato il particellato. Questa può essere calcolata dal diametro dell'apparato di filtrazione che deve essere accuratamente misurato. È necessario inoltre che questo diametro risulti sufficientemente più grande di quello delle finestre di misura della sfera integratrice che si intende usare.

Dopo la filtrazione, le misure spettrofotometriche devono essere effettuate più velocemente possibile per evitare artefatti dovuti alla rapida decomposizione pigmentaria che può avvenire sul filtro (Stramski, 1990). Quando questo non è possibile, il filtro deve essere posto su una apposita capsula Petri (es. Millipore o Pall-Gelman) e subito messo in congelatore a -80°C o meglio immerso in azoto liquido con contenitori adeguati (es. capsule Fisher Histoprep). In queste condizioni il campione può essere conservato anche per un periodo prolungato (massimo alcuni mesi).

In ogni sessione giornaliera di misure devono essere predisposti alcuni filtri bianchi di riferimento. Questi filtri devono essere utilizzati per filtrare, sugli stessi apparati, acqua marina precedentemente filtrata su membrane di 0,2 μm e saranno trattati prima e dopo la filtrazione esattamente come i campioni. I bianchi ed i campioni della stessa sessione di filtrazione devono essere letti allo spettrofotometro nella stessa sessione di misure.

Misure allo spettrofotometro

La bontà delle misure spettrofotometriche con la sfera integratrice dipendono sia dalle condizioni dello standard di diffusione con cui vengono calibrate, sia da quelle delle pareti della sfera (entrambi rivestiti con sostanze diffondenti quali ad es. BaSO₄ o Spectralon). Occorre quindi controllare periodicamente l'efficienza della sfera che con l'età diminuisce, seguendo le procedure suggerite dal costruttore.

I filtri congelati devono essere scongelati al buio ed inumiditi per almeno 30 minuti con alcune gocce di acqua marina filtrata (0,2 μm). Siccome le proprietà ottiche dei filtri dipendono anche dal loro grado di idratazione è necessario assicurarsi che tutti i campioni siano completamente ed omogeneamente idratati per tutto il tempo necessario allo svolgimento delle misure. A questo proposito anche disponendo di sfere

integratrici che consentano di effettuare misure dei campioni contro i bianchi, è preferibile effettuare le due misure separatamente, in quanto i bianchi usati come riferimento per più campioni possono disidratarsi con il tempo ed alterare le loro proprietà ottiche. Inoltre, durante le misure si consiglia di orientare i filtri sempre allo stesso modo, sfruttando a questo fine la trama abbastanza regolare della faccia non utilizzata.

Le misure da effettuare sono quelle di trasmittanza ($T(\lambda)$) e di riflettanza ($R(\lambda)$) nella banda spettrale del visibile, generalmente fra 350 e 750 nm e devono essere eseguite sia sui filtri con il particellato ($T_p(\lambda)$, $R_p(\lambda)$) che sui bianchi ($T_{bp}(\lambda)$, $R_{bp}(\lambda)$). Nelle più comuni sfere integratrici del tipo di Taylor queste misure prevedono spostamenti dell'ubicazione del campione e dell'illuminatore (Geider e Osborne, 1992). Il campione deve essere collocato nelle porte di entrata della sfera con la faccia del filtro con il particellato sempre rivolta verso il raggio luminoso. Nelle misure di trasmittanza il campione è disposto fra la sfera e la sorgente luminosa, mentre nelle misure di riflettanza la sfera separa la sorgente dal campione (LICOR, 1984). Sono inoltre da effettuare ulteriori misure di trasmittanza rigirando il filtro rispetto alle precedenti, cioè rivolgendo verso la sorgente luminosa la faccia bianca del filtro ($T'_{fp}(\lambda)$).

Molta cura deve essere impiegata nelle manovre di cambiamento della disposizione del filtro, in quanto possono facilmente verificarsi alterazioni o perdite di materiale.

Estrazione dei pigmenti

Successivamente i filtri (sia campioni che bianchi) vengono sottoposti alla procedura di estrazione pigmentaria secondo Kishino *et al.* (1985). Ogni filtro dopo la prima serie di misure deve essere posto in un recipiente adeguato nel quale verranno aggiunti, facendo attenzione a non alterare la disposizione del particellato, 3 ml di metanolo assoluto. Il recipiente chiuso deve essere tenuto in frigorifero a 4 °C al buio per alcune ore. Per completare l'estrazione dei pigmenti è necessario ripetere la procedura, recuperando tutto il metanolo, aggiungendone di nuovo 2 ml e lasciare ancora per circa 30 minuti in frigorifero a 4 °C. Recuperato il metanolo, prima delle ulteriori misure di trasmittanza e riflettanza, il filtro deve essere fatto asciugare e nuovamente inumidito con acqua di mare filtrata per almeno 30 minuti al buio.

Analogamente, sui filtri con il particellato non algale e sui rispettivi bianchi, devono essere effettuate le misure di trasmittanza ($T_{fNAP}(\lambda)$, $T_{bNAP}(\lambda)$, $T'_{fNAP}(\lambda)$) e quelle di riflettanza ($R_{fNAP}(\lambda)$, $R_{bNAP}(\lambda)$).

35.2.2.3 Calcoli

Per favorire la comprensione della seguente sezione tutta la simbologia utilizzata è riportata in Tab. 1. La procedura di calcolo dell'assorbanza, $a(\lambda)$, si basa sull'equazione del bilancio radiativo:

$$I(\lambda) = 1 - T(\lambda) - R(\lambda) \quad (1)$$

Dalle misure effettuate sul filtro bianco ($T_{bp}(\lambda)$, $R_{bp}(\lambda)$) e da quelle sull'insieme filtro + particellato ($T_p(\lambda)$, $R_p(\lambda)$) seguendo Tassan e Ferrari (2002) si ottengono (Fig. 1 a-d):

$$\text{la trasmittanza del particellato,} \quad T_p(\lambda) = T_{fp}(\lambda) / T_{bp}(\lambda) \quad (2)$$

$$\text{la riflettanza del particellato,} \quad R_p(\lambda) = R_{fp}(\lambda) / R_{bp}(\lambda) \quad (3)$$

$$\text{l'assorbanza del particellato,} \quad a_p(\lambda) = \frac{1 - T_p(\lambda) + R_{bp}(\lambda)(T_p(\lambda) - R_p(\lambda))}{1 + R_{bp}(\lambda)T_p(\lambda) - R_p(\lambda)} \quad (4)$$

Analogamente, dalle misure effettuate sul filtro bianco passato in metanolo ($T_{bNAP}(\lambda)$, $R_{bNAP}(\lambda)$) e sul filtro con il particellato decolorato ($T_{fNAP}(\lambda)$, $R_{fNAP}(\lambda)$), si ottiene (Fig. 1 a-d):

$$\text{la trasmittanza del NAP,} \quad T_{NAP}(\lambda) = T_{fNAP}(\lambda) / T_{bNAP}(\lambda) \quad (5)$$

$$\text{la riflettanza del NAP,} \quad R_{NAP}(\lambda) = R_{fNAP}(\lambda) / R_{bNAP}(\lambda) \quad (6)$$

$$\text{l'assorbanza del NAP,} \quad a_{NAP}(\lambda) = \frac{1 - T_{NAP}(\lambda) + R_{bNAP}(\lambda)(T_{NAP}(\lambda) - R_{NAP}(\lambda))}{1 + R_{bNAP}(\lambda)T_{NAP}(\lambda) - R_{NAP}(\lambda)} \quad (7)$$

In entrambi i casi la trasmittanza e la riflettanza dei bianchi sono quelle medie di ogni sessione di lavoro ottenute ripetendo le misure su alcuni filtri bianchi.

$t(\lambda)$ è un fattore che tiene conto che la radiazione retrodiffusa dal filtro non è parallela come quella proveniente dalla sorgente luminosa, ma è diffusa. Questo fattore si rende necessario in quanto una frazione dell'assorbimento riguarda la radiazione diffusa, e la trasmittanza a luce diffusa e quella a luce parallela incidente ortogonalmente non sono uguali (così come gli assorbimenti). Tale fattore deve essere introdotto sia per il particellato che per il NAP. Il loro rapporto è espresso dal termine $d(\lambda)$, che si ottiene dividendo la trasmittanza del particellato o del NAP, ottenuta misurando con la faccia bianca del filtro verso la sorgente, con quella ottenuta con il campione verso la sorgente: $d(\lambda) = T'(\lambda)/T(\lambda)$. Questo rapporto per i filtri bianchi che sono un mezzo fortemente diffondente risulta circa uguale a 1 (Tassan e Ferrari, 2002):

$$t_p(\lambda) = (1 - T_p(\lambda)d_p(\lambda)) / (1 - T_p(\lambda)), \text{ con } d_p(\lambda) = T'_{fp}/T_{fp} \quad (8)$$

$$t_{NAP}(\lambda) = (1 - T_{NAP}(\lambda)d_{NAP}(\lambda)) / (1 - T_{NAP}(\lambda)), \text{ con } d_{NAP}(\lambda) = T'_{fNAP}/T_{fNAP} \quad (9)$$

Nel caso che le misure di trasmittanza con il particellato rivolto verso l'interno della sfera non fossero state effettuate, possono essere utilizzate le stime di t_p , t_{NAP} di Tassan e Ferrari (2002). A questo punto tenendo conto che

$$A(\lambda) = -\log(1 - a(\lambda)) \quad (10)$$

si può calcolare (Fig. 1 e-f) l'assorbimento (m^{-1}) del particellato $a_p(\lambda)$:

$$a_p(\lambda) = 2,303 A_p(\lambda) sf / v \quad (11)$$

e analogamente quello del particellato non algale, $a_{NAP}(\lambda)$:

$$a_{NAP}(\lambda) = 2,303 A_{NAP}(\lambda) sf / v \quad (12)$$

dove A_p e A_{NAP} sono rispettivamente la densità ottica del particellato e del particellato non algale, b è il fattore di amplificazione del cammino ottico, sf è la superficie sulla quale si è depositato il particellato sul filtro (m^2) e v è il volume di acqua filtrata (m^3).

L'eventuale incompleta estrazione dei pigmenti presenti nel materiale particellato può essere individuata dalle seguenti caratteristiche dello spettro di $a_{NAP}(\lambda)$: 1) presenza di massimi nelle bande del rosso o del blu caratteristici degli spettri di assorbimento della clorofilla; 2) evidenza della firma spettrale (massimi caratteristici dal verde al giallo-arancio) delle ficobiline e ficocianine insolubili in metanolo, per la presenza nel popolamento fitoplanctonico di cianobatteri o criptofite. In entrambi i casi la procedura di separazione

chimica può essere integrata con una procedura di tipo matematico (Fig. 1 e-f). $a_{NAP}(\lambda)$ presenta una forma assimilabile ad una esponenziale (Roesler *et al.*, 1989) e può essere interpolata nella banda fra 350 e 380 nm, dove il contributo fitoplanctonico residuo è trascurabile, con l'equazione seguente:

$$a'_{NAP}(\lambda) = a_{NAP}(\lambda_0) e^{-S(\lambda - \lambda_0)} + k \quad (13)$$

si ottengono così i parametri per la correzione dell'intero spettro: $a_{NAP}(\lambda_0)$ è l'assorbimento alla lunghezza d'onda di riferimento, generalmente 350 nm, S esprime la pendenza della curva fra 350 e 380 nm e k , che indica il parametro di background, corrisponde al valore $a_{NAP}(750)$. Inserendo nell'equazione (13) questi parametri, la correzione $a'_{NAP}(\lambda)$ può essere estesa a tutto lo spettro. Lo spettro così ricostruito è quello che, in questi casi, approssima in maniera migliore l'assorbimento del particellato depigmentato (Fig. 1 f).

Il coefficiente di assorbimento del fitoplancton ($a_{ph}(\lambda)$) viene calcolato sottraendo allo spettro di assorbimento del particellato quello del NAP (Fig. 1 e-f):

$$a_{ph}(\lambda) = a_p(\lambda) - a_{NAP}(\lambda) \quad (14)$$

L'assorbimento specifico del fitoplancton $a^*_{ph}(\lambda)$ ($m^2 mg^{-1}$ di Chl) si ottiene dividendo $a_{ph}(\lambda)$ (m^{-1}) o per la relativa concentrazione di clorofilla a (Chl a) oppure per la somma di clorofilla a + feopigmenti (Chl) in $mg m^{-3}$. Se le misure di concentrazione dei pigmenti sono ottenute tramite HPLC, generalmente invece della sola clorofilla a si usa la somma di clorofilla a + divinil clorofilla a + clorofillide a (Chl a_{tot}), mentre al posto dei feopigmenti si usa la feofitina a .

Nei campioni naturali (specialmente quelli di acque di caso 2) può verificarsi che, nell'infrarosso vicino, il particellato presenti un assorbimento residuo e siccome in questa banda l'assorbimento del fitoplancton può essere assunto uguale a zero, questo assorbimento deve essere attribuito interamente al particellato non algale. In pratica, l'assorbimento del particellato non algale alla lunghezza d'onda di 750 nm (o meglio la sua media in un intervallo spettrale di almeno 10 nm centrato su questa λ) deve essere aggiustato al valore di quello del particellato alla solita λ slittando di questo valore l'intero spettro.

Per la correzione del fattore b di amplificazione del cammino ottico si consiglia di effettuare, quando possibile, dei confronti fra le misure su filtro e su sospensione il cui rapporto dà b . Nell'impossibilità di svolgere queste misure si possono adottare le stime ottenute da vari autori per specie fitoplanctoniche ed ambienti differenti (Tab. 2 di Mitchell *et al.*, 2000). I valori di b differiscono in relazione alle proprietà diffusive dei campioni e si possono commettere errori anche gravi utilizzando stime non opportune. I campioni più problematici sono quelli con frazioni variabili e significative di particellato inorganico o di cellule picofitoplanctoniche. Comunque utilizzando il metodo $T-R$ gli errori relativi alla scelta del fattore b hanno una criticità ridotta, in quanto le sue variazioni sono molto minori rispetto a quelle legate al metodo che prevede esclusivamente misure di trasmittanza (Tassan *et al.*, 2000). Secondo la nostra esperienza è consigliabile l'utilizzazione delle stime di Bricaud e Stramski (1990) secondo cui:

$$b(\lambda) = 1,63A(\lambda)^{-0,22} \quad (15)$$

in quanto nei casi in cui sono state confrontate, sono risultate molto simili a quelle ottenute sulle sospensioni.

Tab. 1 - Simbologia utilizzata.

Termine	Definizione
l	Lunghezza d'onda, (nm)
b	Rapporto fra l'assorbimento del particellato concentrato sul filtro rispetto a quello della rispettiva sospensione
d	Rapporto fra la trasmittanza a luce diffusa e quella a luce parallela incidente ortogonalmente, dato dal rapporto fra la trasmittanza misurata con il particellato rivolto verso l'interno della sfera e quella misurata con il particellato rivolto verso la sorgente luminosa ($T'(\mathbb{D})/T(\mathbb{D})$). Le due trasmittanze sono praticamente uguali nei filtri bianchi. Questo rapporto viene calcolato sia per il particellato (d_p), che per il <i>NAP</i> (d_{NAP})
t	Fattore che dà conto che la radiazione retrodiffusa dal filtro è diffusa e che d può essere ≈ 1
T_{fp}	Trasmittanza misurata dell'insieme filtro + particellato
T'_{bp}	Trasmittanza misurata dei filtri bianchi
T'_{fp}	Trasmittanza del particellato (T'_{fp}/T'_{bp})
T''_{fp}	Trasmittanza di particellato + filtro misurata con il particellato rivolto verso l'interno della sfera
T_{fNAP}	Trasmittanza misurata dell'insieme filtro + particellato depigmentato in metanolo (<i>NAP</i>)
T_{bNAP}	Trasmittanza misurata dei filtri bianchi passati in metanolo
T_{NAP}	Trasmittanza del particellato non algale (T_{fNAP}/T_{bNAP})
T''_{fNAP}	Trasmittanza di <i>NAP</i> + filtro misurata con il particellato rivolto verso l'interno della sfera
R_{fp}	Riflettanza misurata dell'insieme filtro + particellato
R_{bp}	Riflettanza misurata dei filtri bianchi
R_p	Riflettanza del particellato (R_{fp}/R_{bp})
R_{fNAP}	Riflettanza misurata dell'insieme filtro + particellato depigmentato in metanolo (<i>NAP</i>)
R_{bNAP}	Riflettanza misurata dei filtri bianchi passati in metanolo
R_{NAP}	Riflettanza del particellato non algale (R_{fNAP}/R_{bNAP})
a_p	Assorbanza del particellato
a_{NAP}	Assorbanza del particellato depigmentato (<i>NAP</i>)
A_p	Densità ottica del particellato
A_{NAP}	Densità ottica del particellato non algale
a_p	Assorbimento del particellato, (m^{-1})
a_{NAP}	Assorbimento del particellato non algale, (m^{-1})
a'_{NAP}	Assorbimento del particellato non algale corretto (m^{-1}) ricostruito con l'equazione (13)
k	Parametro di background di a'_{NAP} () corrispondente ad a_{NAP} (750), (m^{-1})
a_{ph}	Assorbimento del fitoplancton (m^{-1})
a'_{ph}	Assorbimento corretto del fitoplancton, $a'_{ph} = a_p - a'_{NAP}$, (m^{-1})
a^*_{ph}	Assorbimento specifico (<i>cross section</i>) del fitoplancton, ($m^2 \text{ mg}^{-1}$ di Chl)
S	Fattore di decremento esponenziale di a'_{NAP} all'aumentare di l , (nm^{-1})
sf	Superficie del filtro su cui si è distribuito il particellato, (m^2)
v	Volume di acqua marina filtrata, (m^3)

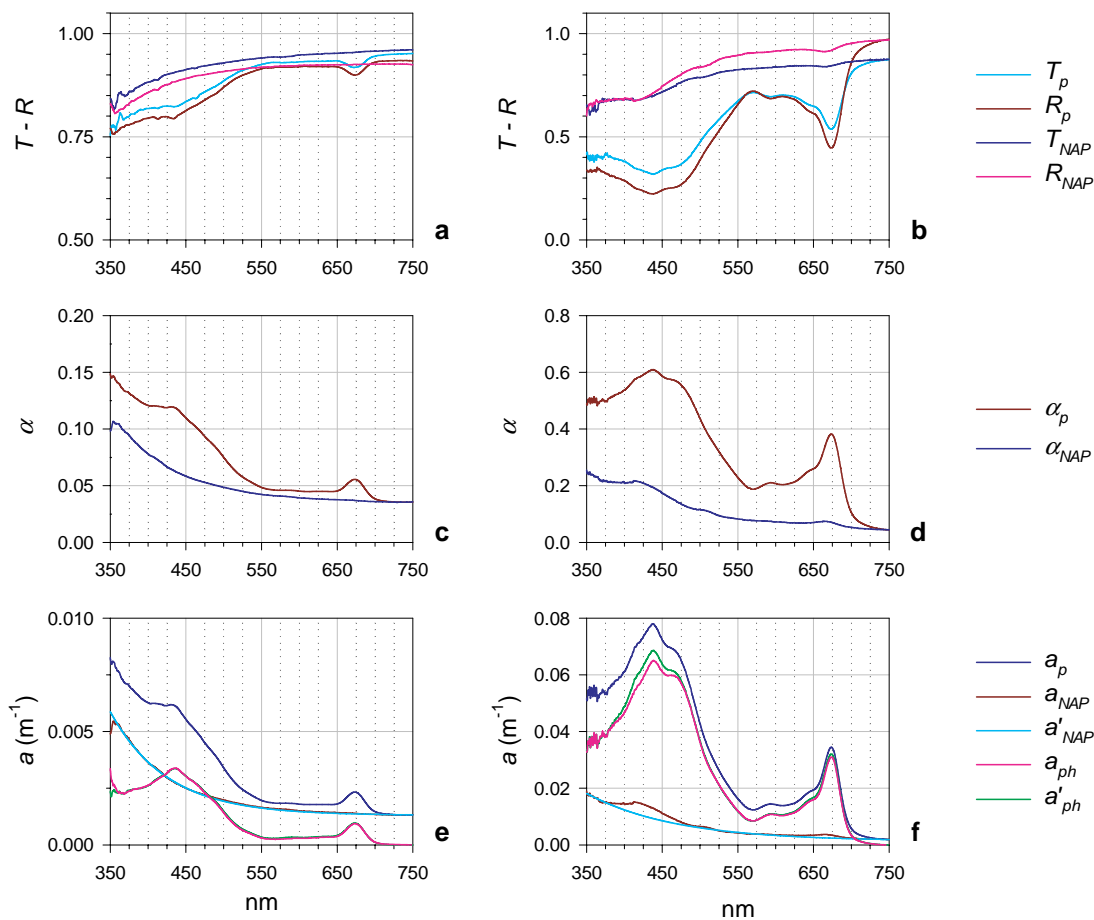


Fig. 1 - Spettri esemplificativi dei vari passaggi nel calcolo degli assorbimenti in due campioni naturali, oligotrofico (a,c,e) ed eutrofico (b,d,f): a,b trasmittanze e riflettanze di particolato e NAP (eq. 2, 5 e 3, 6); c, d assorbimenti di particolato e NAP (eq. 4, 7); e, f assorbimenti di particolato, NAP e fitoplancton (eq. 11, 12, 14). In f sono riportati a_{NAP} (eq. 12) in cui risulta evidente la non completa estrazione pigmentaria, e la funzione interpolante a'_{NAP} (eq. 13) usata per eliminare questo problema; sono inoltre mostrati 2 spettri di assorbimento del fitoplancton, quello con massimi più elevati a'_{ph} è stato ottenuto sottraendo (eq. 14) ad a_p lo spettro del NAP corretto (a'_{NAP}).

35.3 FLUORESCENZA FITOPLANCTONICA

Le proprietà biofisiche dei pigmenti fitoplanctonici e la loro strutturazione in unità fotosintetiche funzionali determinano, a temperatura ambiente, emissione di fluorescenza rossa da parte dei centri di reazione del fotosistema PSII, in seguito ad eccitazione nel visibile. In ecologia acquatica questa proprietà viene utilizzata da decenni (Lorenzen, 1966) per rilevare in modo rapido e sensibile la presenza di organismi fototrofi. Una strumentazione ormai consolidata che sfrutta queste proprietà, si è diffusa e sviluppata sia in campo oceanografico che limnologico, per indagini sulla distribuzione spaziale e temporale del fitoplancton. Grazie essenzialmente a questo tipo di misure si è potuta ad esempio analizzare la caratteristica distribuzione a chiazze del fitoplancton oceanico (Platt, 1972; Ascoti *et al.*, 1993) o rivelare la presenza dei massimi di clorofilla profondi (DCM). Alle prime sonde con sorgenti di eccitazione potenti (xenon) e rilevatori sensibili (PM) i progressi della tecnologia elettronica hanno affiancato strumenti basati su fotodiodi e filtri interferenziali per eccitare e rilevare il segnale (Beutler *et al.*, 1998). Sonde di questo tipo sono state recentemente abbinate anche a misure XBT di temperatura e profondità da nave in mo-

vimento (Marcelli *et al.*, 2007). Vanno tuttavia considerati due principali motivi di cautela nell'uso delle misure di fluorescenza fitoplanctonica: 1) l'efficienza di emissione *in vivo* della fluorescenza è bassa (<5%) ed assai variabile in funzione di un elevato numero di fattori sia ambientali che fisiologici; 2) le misure di fluorescenza sono in unità relative perché dipendono dalle caratteristiche dello strumento utilizzato. Le principali cause ambientali di variabilità dell'efficienza sono la luce, la temperatura e la concentrazione di nutrienti (Falkowski e Raven, 1997); alcune delle cause fisiologiche sono la composizione pigmentaria, la presenza di bioritmi, l'induzione di fluorescenza variabile e l'entità del *non photochemical quenching* (Falkowski e Raven, 1997; Muller *et al.*, 2001).

Possono interferire, inoltre, le fluorescenze di altri fluorocromi presenti in mare, come la sostanza gialla o gilvina. Infine, alle elevate concentrazioni, si possono verificare fenomeni di interazione della fluorescenza con l'assorbimento, in quanto una parte della radiazione emessa viene riassorbita dalle stesse strutture pigmentarie.

Successivamente, con l'aumentare delle conoscenze relative a questo processo, vari aspetti della variabilità dell'efficienza di emissione della fluorescenza in rapporto alla clorofilla *a* sono stati utilizzati per la stima di alcune caratteristiche eco-fisiologiche del fitoplancton; due in particolare:

1) La presenza di alcuni dei principali gruppi tassonomici del fitoplancton può essere individuata mediante misure di emissione della fluorescenza, eccitando alle lunghezze d'onda specifiche dei pigmenti accessori (clorofille *b* e *c*, carotenoidi, ficobiline) caratterizzanti questi gruppi (Yentsch e Yentsch, 1979; Yentsch e Phynney, 1985; Lazzara e Innamorati, 1985). Sulla base delle caratteristiche spettrali di eccitazione ed emissione si possono identificare 5 diversi gruppi pigmentari riassunti in Tab. 2 (Lazzara, 1995; Beutler *et al.*, 1998). Con questo scopo di discriminazione sono state costruite e commercializzate delle sonde spettrali che dispongono di una serie di coppie eccitazione/emissione calibrate per individuare i differenti pigmenti accessori sulla base di una architettura a diodi e filtri interferenziali (WetLabs, Safire; Walz, Fito-PAM; bbe-Moldaenke, Fluoro Probe), che possono essere in grado di individuare anche altri fluorocromi in soluzione come gli acidi umici (gilvina). In Tab. 2 sono riportate le caratteristiche spettrali specifiche dei pigmenti accessori che consentono l'attribuzione del segnale di fluorescenza ad organismi di un particolare taxon fitoplanctonico.

2) Lo studio della cinetica dell'emissione di fluorescenza su cellule fotosintetiche dopo la loro esposizione al buio ha evidenziato la presenza di alcune differenti fasi del processo (*Kautsky Curve*) in stretto legame con lo svolgimento del processo fotosintetico e quindi la complementarità dei due processi. Su questa base può essere stimata la frazione dell'energia radiante assorbita che andrà ad alimentare il processo fotochimico (*photochemical quenching*) e quella che andrà dissipata come calore (*non photochemical quenching*), come descritto nel capitolo 31.

La modalità di misura più completa degli spettri di eccitazione ed emissione di fluorescenza di una complessa matrice acquosa, tuttavia, si realizza con spettrofluorimetri da laboratorio, generalmente più sensibili e nei quali è assai maggiore il controllo delle caratteristiche spettrali delle diverse componenti strumentali.

35.3.1 Fluorescenza spettrale

La misura degli spettri di eccitazione della fluorescenza emessa *in vivo* dalla clorofilla *a* fornisce al tempo stesso informazioni sulla composizione pigmentaria e sul funzionamento dell'intero sistema fotosintetico. Quindi gli spettri di eccitazione della fluorescenza solo apparentemente danno informazioni analoghe agli spettri di assorbimento, piuttosto consentono una valutazione dello spettro di azione della fotosintesi attraverso una stima diretta del trasferimento di energia dai pigmenti accessori al centro di reazione del PSII (Neori *et al.*, 1986). Diviene così possibile un riconoscimento funzionale della presenza di pigmenti inattivi nella fotosintesi, come i carotenoidi fotoprotettori. Queste misure sono adatte dunque ad approfondire gli studi sulle capacità di fotoadattamento e sulla produzione primaria. Infine dalle misure spettrali congiunte di eccitazione della fluorescenza con quelle di assorbimento del fitoplancton, possono

essere ricavati gli spettri del rendimento quantico di fluorescenza che in certe condizioni risulta variare in modo diretto e lineare con il rendimento quantico della fotosintesi, un parametro di fondamentale importanza sia per la definizione di stime corrette della produzione primaria che per la comprensione delle strategie di fotoadattamento (Lazzara, 1995; Lazzara *et al.*, 1996).

La notevole variabilità delle caratteristiche spettrali dei popolamenti fitoplanctonici può essere schematizzata in pochi “gruppi pigmentari” come suggerito da vari autori (Yentsch e Phinney, 1985; Lazzara, 1999).

In Tab. 2 vengono descritti cinque gruppi pigmentari con i corrispondenti gruppi tassonomici di fitoplancton marino, con i pigmenti caratterizzanti e le specifiche coppie di eccitazione/emissione che costituiscono la loro firma spettrale in fluorescenza.

Tab. 2 - Taxa fitoplanctonici, gruppi pigmentari e pigmenti, con le caratteristiche coppie di eccitazione/emissione della fluorescenza in vivo dei popolamenti fitoplanctonici marini, separabili con spettrofluorimetria.

Taxa fitoplanctonici	Gruppo pigmentario	Pigmenti caratterizzanti	Coppie ex/em di Fl <i>in vivo</i> (nm)	
Bacillariofitee	A-C	Chl <i>a</i>	435/682	
Dinofitee		Chl <i>c</i>	465/682	
Rafidofitee		Carotenoidi PS		520/682
Prinnesiofitee				
Clorofitee	A-B	Chl <i>a</i>	435/685	
Prasinofitee		Chl <i>b</i>	475/685	
Criptofitee	A-C-PE	Chl <i>a</i>	445/682	
		Chl <i>c</i>	470/682	
		PE	555/592	
Cianofitee	A-PC-PE	Chl <i>a</i>	432/682	
		PE	550/590	
		PC	625/660	
<i>Prochlorococcus</i>	DVA-B	DVChl <i>a</i>	445/680	
		DVChl <i>b</i>	475/680, 600/680	

35.3.2 Metodo

35.3.2.1 Materiale occorrente

- Membrane Nuclepore 0,2 m m, Ø 25 mm
- Filtri in fibra di vetro GF/C da Ø 25 mm
- Vetreria da laboratorio, cilindri graduati, pipette, pinzette per filtri, tubi in tygon 16-8 mm, ecc.
- Apparato di filtrazione con pompa a vuoto regolabile, trappola
- Spettrofluorimetro con correzione quantica dell'eccitazione ed elevata sensibilità nel rosso
- Cuvette da fluorimetria a quattro pareti ottiche, in quarzo
- Soluzione di DCMU in metanolo (10^{-3} M).

35.3.2.2 Schema delle operazioni

Campionamento e concentrazione

I campioni di acqua marina necessari per le analisi vengono ottenuti usando bottiglie di campionamento tipo Niskin. L'acqua va trasferita immediatamente tramite tubi puliti in tygon in bottiglie di vetro scuro di circa 1 l mantenute prima delle misure (che comunque devono avvenire immediatamente dopo il campionamento) a luce bassa e ad una temperatura non troppo dissimile da quella a cui erano sottoposte in mare.

Dato lo scarso rendimento della fluorescenza *in vivo* (sempre inferiore al 10 % di quella degli stessi pigmenti in soluzione), le misure spettrali di eccitazione della fluorescenza sono più agevolmente effettuate in seguito a concentrazione del campione naturale. La procedura di concentrazione risulta necessaria per ottenere spettri sufficientemente accurati a tutte le lunghezze d'onda, ad esempio su popolamenti naturali con concentrazioni di clorofilla *a* < 10 mg m⁻³ e con uno strumento che abbia un rapporto segnale rumore (S/N) > 70. Questa procedura consiste in una leggera concentrazione del campione, aumentando da 3 a 10 volte quella iniziale, mediante delicata filtrazione (membrane in policarbonato Nuclepore porosità 0,2 m m, sovrapposta al filtro GF/C) da effettuare a bassa depressione (100 mm Hg) in luce soffusa e mantenendo la continua risospensione del campione tramite pipetta, così da impedire la formazione di una patina sul filtro.

Misure allo spettrofluorimetro

La fluorescenza dei popolamenti fitoplanctonici deve essere misurata allo spettrofluorimetro direttamente sulla sospensione. Lo strumento utilizzato è opportuno che consenta una correzione quantica della eccitazione, che generalmente avviene mediante un riferimento basato sulla risposta stabile della rodamina B. Questa tecnica consente di ottenere spettri di eccitazione della fluorescenza corretti fino a 630-640 nm, lunghezze d'onda che costituiscono il limite superiore per la correzione quantica ottenibile con la rodamina B, a causa della deformazione spettrale della risposta dello strumento. Inoltre lo spettrofluorimetro dovrebbe essere dotato di un fotomoltiplicatore particolarmente sensibile nel rosso dove si colloca l'emissione della clorofilla *a*.

Durante le misure e specialmente se queste si protraggono per alcune ore, la deriva temporale della risposta dello strumento deve essere controllata (anche ogni ora) ed eventualmente corretta ad esempio leggendo la fluorescenza di feopigmenti inclusi in resine di polimetacrilato (J. Neveux, comunicazione personale, 1991) utilizzando sempre le stesse lunghezze d'onda come eccitazione/emissione.

Prima di effettuare le misure di fluorescenza, al campione deve essere aggiunto l'inibitore della fotosintesi DCMU (3-(3,4-diclorofenil) - 1,1-dimetilurea) alla concentrazione finale di 20 µM, ed essere sottoposto per circa 1 minuto ad una irradianza saturante (Neori *et al.*, 1986; Johnsen e Sakshaug, 1993) cosicché si misuri un valore prossimo alla fluorescenza massima (F_m) e relativamente costante (Samuelsson e Oquist, 1977).

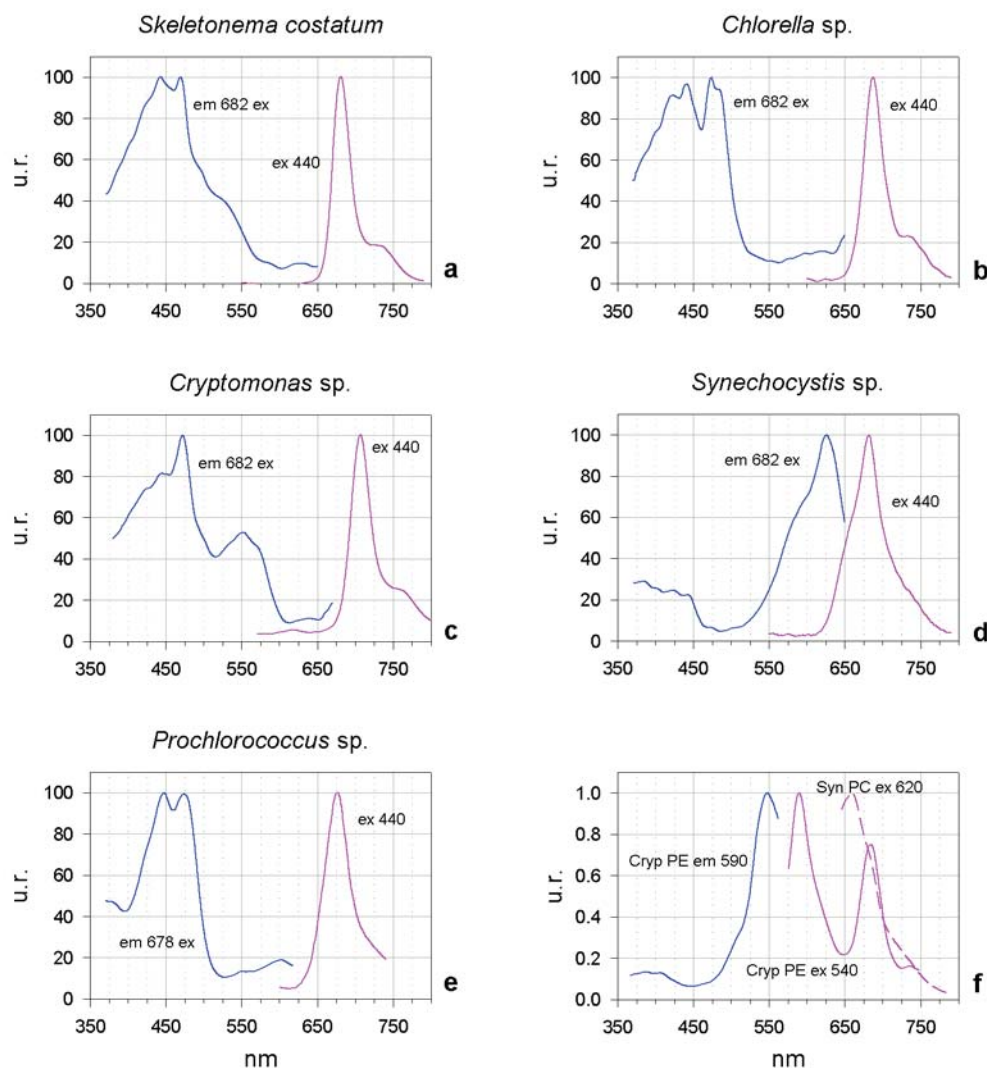


Fig. 2 - Spettri normalizzati al massimo, della eccitazione ed emissione *in vivo* di fluorescenza, da parte di colture mono-specifiche di fitoplancton. Le specie sono rappresentative dei cinque gruppi pigmentari di Tab. 2. a) *Skeletonema costatum* del gruppo **A-C**; b) *Chlorella* sp. gruppo **A-B**; c) *Cryptomonas* sp. gruppo **A-C-PE**; d) *Synechocystis* sp. gruppo **A-PC-PE**; e) *Prochlorococcus* sp. gruppo **DVA-B**. In f) gli spettri di fluorescenza sono dovuti principalmente alla emissione da parte di ficobiline disaccoppiate dai centri di reazione, così che sono messe in evidenza le specifiche caratteristiche spettrali dei loro fluorocromi.

Le misure sui campioni naturali allo spettrofluorimetro devono partire da una serie effettuata a coppie di eccitazione/emissione a lunghezze d'onda fisse: ad es. 440/682 nm per evidenziare la presenza della clorofilla *a*; 490/590 nm quella della ficourobilina (PUB); 540/590 nm per la ficoeritrobilina (PEB). In queste misure può essere opportuno mediare (o integrare) il segnale di fluorescenza per un certo tempo (anche 3 minuti). Le stesse misure alle coppie di eccitazione/emissione suddette, devono essere ripetute dopo la procedura di concentrazione. Il rapporto fra le misure ottenute dopo la concentrazione e quelle precedenti dà il valore di quanto devono essere scalate le misure spettrali per riportarle alla concentrazione del campione naturale.

Per ogni campione le misure devono essere effettuate sottraendo la fluorescenza emessa nelle stesse condizioni di eccitazione data dal campione filtrato (Nuclepore 0,2 μ m), in particolare per eliminare la diffusione Raman e la fluorescenza della sostanza organica disciolta.

Poiché la diffusione della luce di eccitazione supera di alcuni ordini di grandezza quella emessa per fluorescenza, in quasi tutti gli spettrofluorimetri non provvisti di una apposita correzione del segnale, va evitata con cura la sovrapposizione dello spettro di eccitazione con quello di emissione. Gli intervalli opportuni per la scansione degli spettri dipendono anche dalla ampiezza delle fenditure dei rispettivi monocromatori.

A titolo di esempio, con le fenditure dei monocromatori di eccitazione ed emissione poste a 10 nm, gli spettri di fluorescenza della clorofilla *a*, che ha emissione massima a 682 nm, si misurano in eccitazione tra 360 e 640 nm, mentre quelli in emissione tra 600 e 780 nm, con eccitazione a 440 nm (Fig. 2a-e). Gli spettri di fluorescenza della ficoeritrina (PE) invece, che ha emissione massima a 592 nm, si misurano in eccitazione tra 360 e 560 nm ed in emissione tra 570 e 780 nm eccitando a 540 nm (con il massimo che si trova a 550 nm, Fig. 2c). Gli spettri di fluorescenza della ficocianina (PC) con il massimo di emissione a 660 nm si misurano in eccitazione tra 360 e 640 nm ed in emissione tra 650 e 780 nm, eccitando a 620 nm (con il massimo posto a 625 nm, Fig. 2d).

Ringraziamenti

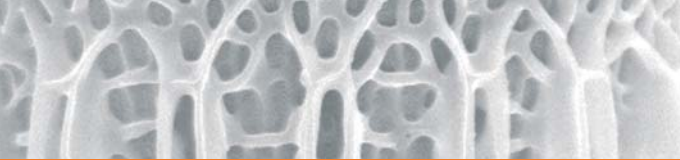
Si ringraziano il Dott. Emanuele Organelli e la Dott.ssa Chiara Melillo per la collaborazione.

35.4 BIBLIOGRAFIA

- ALLALI K., BRICAUD A., BABIN M., MOREL A., CHANG P. (1995) - A new method for measuring spectral absorption coefficients of marine particles. *Limnol. Oceanogr.*, **40**: 1526-1532.
- ASCIOTI F.A., BELTRAMI E., CARROLL T.O., WIRICK C. (1993) - Is there chaos in plankton dynamics? *J. Plankton Res.*, **15**: 603-617.
- BEUTLER M., WILTSHIRE K.H., MEYER B., MOLDAENKE C., DAU H. (1998) - Rapid depth-profiling of the distribution of 'spectral groups' of microalgae in lakes, rivers and in the sea. In: Garab G. (ed), *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands: 4301-4304.
- BIDIGARE R.R., ONDRUSEK M.E., MORROW J.H., KIEFER D.A. (1990) - *In vivo* absorption properties of algal pigments. *Ocean Optics X*, **1302**: 290-302.
- BRICAUD A., STRAMSKI D. (1990) - Spectral absorption coefficients of living phytoplankton and non-algal biogenous matter: a comparison between the Peru upwelling area and the Sargasso Sea. *Limnol. Oceanogr.*, **35** : 562-582.
- BRICAUD A., BABIN M., MOREL A., CLAUSTRE H. (1995) - Variability in the chlorophyll-specific absorption coefficients of natural phytoplankton: analysis and parameterization. *J. Geophys. Res.*, **100**: 13321-13332.
- BUTLER W.L. (1962) - Absorption of light by turbid material. *J. Opt. Soc. Am.*, **52**: 292-299.
- CLEVELAND J., PERRY M.J. (1994) - A model for partitioning particulate absorption into phytoplanktonic and detrital components. *Deep Sea Res.*, **41**: 197-221.
- DUNTLEY S.Q. (1942) - The optical properties of diffusing materials. *J. Opt. Soc. Am.*, **32**: 61-70.
- DUYSENS L.N.M. (1956) - The flattening of the absorption spectrum of suspensions as compared to that of solution. *Biochim. Biophys. Acta*, **19**: 1-12.
- FALKOWSKI P.G., RAVEN J.A. (1997) - *Aquatic Photosynthesis*. Blackwell Science, Oxford: 375 pp.
- GEIDER R.J., OSBORNE B.A. (1992) - *Algal Photo-Synthesis. The Measurement of Algal Gas Exchange. Current Phycology 2*. Chapman and Hall, New York: 256 pp.
- JOHNSEN G., SAKSHAUG E. (1993) - Bio-optical characteristics and photoadaptive responses in the toxic and bloom-forming dinoflagellates *Gyrodinium aureolum*, *Gymnodinium galatheanum*, and two strains of *Prorocentrum minimum*. *J. Phycol.*, **29**: 627-642.
- KIEFER D.A., SOOHOO J.B. (1982) - Spectral absorption by marine particles of coastal waters of Baja California. *Limnol. Oceanogr.*, **27**: 492-499.
- KIRK J.T.O. (1994) - *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*. Cambridge University Press, New York: 509 pp.
- KISHINO M., TAKAHASHI M., OKAMI N., ICHIMURA S. (1985) - Estimation of the spectral absorption coefficient of phytoplankton in the sea. *Bull. Mar. Sci.*, **37**: 634-642.

-
- KROMKAMP J.C., FOSTER R.M. (2003) - The use of variable fluorescence measurements in aquatic ecosystems: differences between multiple and single turnover measuring protocols and suggested terminology. *Eur. J. Phycol.*, **38**: 103-112.
- INNAMORATI M. (1990) - Misurazione dell'irradianza. In: Innamorati M., Ferrari I., Marino D., Ribera D'Alcalà M. (eds), *Metodi nell'ecologia del plancton marino*. Nova Thalassia, LINT, Trieste: 11-67.
- LAZZARA L. (1995) - Phytoplankton pigments: photoadaptation, *in vivo* optical properties and primary production estimates. *Gio. Bot. Ital.*, **129**: 1244-1255.
- LAZZARA L. (1999) - *In vivo* optical properties and characterisation of phytoplankton pigments for algal bloom detection and monitoring. *Rapp. ISTISAN 99*, **8**: 25-34.
- LAZZARA L., INNAMORATI M. (1985) - Spectres de fluorescence *in vivo* et composition des peuplements phytoplanktoniques dans l'Adriatique Septentrionale. *Rapp. Comm. Int. Mer Médit.*, **29**: 111-114.
- LAZZARA L., BRICAUD A., CLAUSTRE H. (1996) - Spectral absorption and fluorescence excitation properties of phytoplanktonic populations at a mesotrophic and an oligotrophic site in the Tropical North Atlantic (EUMELI program). *Deep Sea Res. I*, **43**: 1215-1240.
- LI-COR (1984) - *LI 1800 Portable Spectroradiometer Instruction Manual*. Publication No. 8405-0037: 152 pp.
- LORENZEN C.J. (1966) - A method for the continuous measurements of *in vivo* chlorophyll concentration. *Deep Sea Res.*, **13**: 223-227.
- MARCELLI M., DI MAIO A., DONIS D., MAINARDI U., MANZELLA G.M.R. (2007) - Development of a new expendable probe for the study of pelagic ecosystems from voluntary observing ships. *Ocean Sci.*, **3**: 311-320.
- MARRA J., TREES C.C., O'REILLY J.E. (2008) - Phytoplankton pigments absorption: A strong predictor of primary productivity in surface ocean. *Deep Sea Res. I*, **154**: 155-163.
- MASELLI F., MASSI L., PIERI M., SANTINI C. (2009) - Spectral angle minimization for the retrieval of optically active seawater constituents from MODIS data. *Photogramm. Eng. Rem. S.*, **75**: 595-605.
- MASSI L., BIONDI N., INNAMORATI M., LAZZARA L. (1997) - L'assorbimento della luce da parte del fitoplancton e del detrito. *Biol. Mar. Mediterr.*, **4**: 66-73.
- MITCHELL B.G. (1990) - Algorithms for determining the absorption coefficient of aquatic particulates using the quantitative filter technique (QFT). *Ocean Optics X*, **1302**: 137-148.
- MITCHELL B.G., BRICAUD A., CARDER K., CLEVELAND J., FERRARI G., GOULD R., KAHRU M., KISHINO M., MASKE H., MOISAN T., MOORE L., NELSON N., PHINNEY D., REYNOLDS R., SOSIK H., STRAMSKI D., TASSAN S., TREES C., WEIDMANN A., WEILAND J., VODACEK A. (2000) - Determination of spectral absorption coefficients of particles dissolved material and phytoplankton for discrete water sample. In: Fargion G., Mueller J.L. (eds), *Ocean Optics protocols for satellite ocean colour sensor validation, Revision 2*, NASA/TM-2000: 125-153.
- MITCHELL B.G., KAHRU M., WEILAND J., STRAMSKA M. (2002) - Determination of spectral absorption coefficients of particles dissolved material and phytoplankton for discrete water sample. In: Mueller J.L., Fargion G., McClain C.R. (eds), *Ocean Optics Protocols for Satellite Ocean Color Sensor Validation, Revision 4*, NASA/TM-2003: 39-59.
- MOREL A. (1988) - Optical modeling of the upper ocean in relation to its biogenous matter content (case I waters). *J. Geophys. Res.*, **93**: 10749-10768.
- MOREL A., BRICAUD A. (1981) - Theoretical results concerning light absorption in a discrete medium, and application to specific absorption of phytoplankton. *Deep Sea Res.*, **28**: 1375-1393.
- MUELLER J.L., FARGION G., MC CLAIN C.R. (2002) - *Ocean Optics Protocols for Satellite Ocean Colour Sensor Validation, Revision 4*, NASA/TM-2003: 76 pp.
- MULLER P., LE X.P., NIYOGI K.K. (2001) - Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiol.*, **125**: 1558-1566.
- NEORI A., HOLM-HANSEN O., HAXO F.T. (1986) - Relationship between action spectra for chlorophyll *a* fluorescence and photosynthetic O₂ evolution in algae. *J. Plankton Res.*, **8**: 537-548.
- PLATT T. (1972) - Local phytoplankton abundance and turbulence. *Deep Sea Res.*, **19**: 183-187.
- PRIVOZNIK K.G., DANIEL K.J., INCROPERA F.P. (1978) - Absorption, extinction and phase function measurements for algal suspensions of *Chlorella pirenoidosa*. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Trans.*, **20**: 345-352.
- ROESLER C.S., PERRY M.J., CARDER K. (1989) - Modelling *in situ* phytoplankton absorption from total absorption spectra in productive inland marine waters. *Limnol. Oceanogr.*, **34**: 1510-1523.
- SAMUELSSON G., OOQUIST G. (1977) - A method for studying photosynthetic capacities of unicellular algae based on *in vivo* chlorophyll fluorescence. *Physiol. Plant.*, **40**: 315-319.
-

-
- SHIBATA K., BENSON A.A., CALVIN M. (1954) - The absorption spectra of suspension of living microorganism. *Biochim. Biophys. Acta*, **15**: 461-470.
- STRAMSKI D. (1990) - Artifacts in measuring absorption spectra of phytoplankton collected on a filter. *Limnol. Oceanogr.*, **35**: 1804-1809.
- TASSAN S., FERRARI G.M. (1995) - An alternative approach to absorption measurements of aquatic particles retained on filters. *Limnol. Oceanogr.*, **40**: 1358-1368.
- TASSAN S., FERRARI G.M. (2002) - A sensitivity analysis of the "Transmittance-Reflectance" method for measuring light absorption by aquatic particles. *J. Plankton Res.*, **24**: 757-774.
- TASSAN S., FERRARI G.M., BRICAUD A., BABIN M. (2000) - Variability of the amplification factor of light absorption by filter retained aquatic particles in the coastal environment. *J. Plankton Res.*, **22**: 659-668.
- YENTSCH C.S. (1957) - A non extractive method for the quantitative estimation of chlorophyll in algal cultures. *Nature*, **179**: 1302-1304.
- YENTSCH C.S. (1962) - Measurements of visible light absorption by particulate matter in the ocean. *Limnol. Oceanogr.*, **7**: 207-217.
- YENTSCH C.S., PHINNEY D.A. (1985) - Spectral fluorescence: an ataxonomic tool for studying the structure of phytoplankton population. *J. Plankton Res.*, **7**: 617-632.
- YENTSCH C.S., YENTSCH C.M. (1979) - Fluorescence spectral signature: the characterization of phytoplankton populations by use of excitation and emission spectra. *J. Mar. Res.*, **37**: 471-483.



ISBN 978-88-448-0427-5



9 788844 804275